

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D	28 APR 1999
WIPO	PCT

EU

Bescheinigung

ep 99/01014

Das Institut für Physikalische Hochtechnologie e.V. in Jena/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Mikro-Temperaturzonen-Flußreaktor (μ -TZFR)"

am 11. Februar 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole B 01 L, G 01 N und C 12 M der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 4. März 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 198 05 350.9

Patentanwaltsbüro Pfeiffer & Partner, Helmholtzweg 4, D-07743 Jena, Allemagne
Telefax: +49 (0)3641 823111 / Telefon: +49 (0)3641 302909

Telefaxnr. / Telefax No. / N° de télécopie	089 2195 2221
Ihr Zeichen / Your ref. / Vos réf.	
Unser Zeichen / Our sign / Nous réf.	P0951
Telefax Nachricht an: / Telefax message to: / Télécopie pour:	
Seitenzahl incl. dieser/ No. of pages incl. this one/ Nombre de pages, y compris la présente:	7

An das
Deutsche Patentamt

80297 München

11. Februar 1998

- Sie keine leserlichen Kopien aller Seiten erhalten haben, unterrichten Sie uns bitte per Telefax oder Telefon.
- If you do not receive legible copies of all pages, please notify us by facsimile or telephone.
- Si vous ne recevez pas une copie lisible de toutes les pages, veuillez nous en avertir par télécopie ou téléphone.

Vertraulichkeit

Dieses Telefax ist nur für die oben genannte Person bestimmt und kann vertrauliche Informationen enthalten. Wenn Sie nicht der bestimmungsgemäße Empfänger sind, beachten Sie bitte, daß jede Veröffentlichung, Vervielfältigung, Verteilung oder der Gebrauch jeglicher Information, die in diesem Telefax enthalten ist, **streng verboten** ist. Wenn Sie das Telefax versehentlich erhalten haben, unterrichten Sie uns bitte unmittelbar per Telefax oder Telefon und senden das erhaltene Telefax an uns per Post zurück. Wir danken Ihnen im voraus.

Confidentiality Notice

This facsimile is intended only for the person indicated above and may contain confidential information. If you are not the intended recipient, please note that any disclosure, copying, distribution or use of any information contained in this facsimile is **strictly prohibited**. If you have received this facsimile in error, please immediately notify us by facsimile or telephone and mail the original of facsimile as received to us. Thank you in advance.

Confidentialité

Cette télécopie est destinée uniquement à la personne mentionnée ci-dessus et peut contenir des informations confidentielles. Si vous n'êtes pas le destinataire normal vous êtes prié de noter que toute divulgation, copie, diffusion ou tout usage de toute information contenue dans cette télécopie est **strictement interdit** et engagerait votre responsabilité. Si vous avez reçu cette télécopie par erreur, veuillez avoir l'obligeance de nous en avertir immédiatement par télécopie ou téléphone et de nous renvoyer par retour du courrier l'original de la télécopie reçue. Nous vous en remercions par avance.

Neue Patentanmeldung

Titel: **Mikro-Temperaturzonen-Flußreaktor (μ -TZFR)**

Anmelder: **Institut für Physikalische Hochtechnologie e.V.
Helmholtzweg 4, D-07743 Jena**

μ -Temperaturzonen-Flußreaktor (μ -TZFR)

1. Zweck:

Zyklisches Erwärmen und Abkühlen von Lösungen auf drei Temperaturstufen (A,B,C) im kontinuierlichen Fluß auf engstem Raum (Mikrometer-Abmessungen) um drei Reaktion (z.B. Denaturierung, Annealing und Extension an DNS) in einer Probe wiederholt und unter Beibehaltung der Reihenfolge durchführen zu können. Dabei können verschiedene Proben hintereinander injiziert werden, ohne miteinander zu vermischen, und anschließend geordnet in Probenkammern abgelegt werden.

2. Kurzbeschreibung:

Ausführung a) Es werden drei mikrostrukturierte Chips (z.B. aus Silizium) um einen die Wärme schlechter leitenden Verbindungschip (z.B. aus Pyrexglas) angeordnet. Jeder Mikrochip repräsentiert ein Temperaturzone (Chip A, Chip B, Chip C). Die Chips A, B und C sind mit Kanälen derart ausgestattet, daß die Probenflüssigkeit von A nach B nach C und wieder nach A nach B nach C usw. gelangt (siehe Abbildung 1 und 3). Der Verbindungschip ist mit Bohrungen versehen, durch die die Proben von A nach B und nach C gelangen. Die Temperaturchips sind dabei alternierend um den Verbindungschip angeordnet, so daß die Temperaturzonen thermisch voneinander isoliert werden. Innerhalb eines jeden Temperaturzonenchips führt dessen höhere Wärmeleitfähigkeit zu einer homogenen Temperaturverteilung der Flüssigkeit in ihrer jeweiligen Temperaturzone. Zudem werden auf die Chips A, B und C Heizer- und Fühlerstrukturen in Dünnschichttechnologie integriert. Eine externe Kühlung kann sich auf die kälteste Zone beschränken. Dazu wird ein Kühlblock auf die Oberfläche des kältesten Chips befestigt. Alternativ ist auch die Kühlung mit einem Luftstrom möglich.

Chip B ist mit einem Rückführungskanal ausgestattet, dessen Querschnitt derart klein gewählt wird, daß die Verweildauer der Probe während der Rückführung von C nach A in B minimiert wird. Dadurch reicht die Zeit nicht, um die Probe auf die Temperatur B zu bringen, sie behält weitgehend die Temperatur C bei. Der Rückführungskanal kann zudem vom Chip B thermisch isoliert werden.

Ausführung b) Sie entspricht weitgehend der Ausführung a), mit dem Unterschied, daß alle drei Zonen auf einem Chip untergebracht sind (siehe Abbildung 2). Die thermische Isolation wird hierbei durch durchgehende Löcher zwischen den Zonen realisiert (Thermogaps). Der Verbindungschip übernimmt bei dieser Anordnung die Deckelung der Kanäle.

3. Die Verwendung eines transparenten Materials (z.B. Pyrexglas) für den Verbindungschip erlaubt zudem die optische in situ Detektion von Reaktionspartnern in der Probe.

Die Proben werden als Tropfen nacheinander in einen kontinuierlichen Trägerflüssigkeitsstrom injiziert, der durch den μ -Temperaturzonen-Flußreaktor gepumpt wird. Die Trägerflüssigkeit darf sich nicht mit der Probenflüssigkeit vermischen. Dadurch können unterschiedliche Proben nacheinander verarbeitet werden, ohne sich zu vermischen. Diese Technologie ist die Voraussetzung für eine Integration eines Seriell - in - Parallel - Konverters (SPK):

Durch Aufhängen des μ -Temperaturzonen-Flußreaktors an eine xy-Verschiebeeinheit kann die serielle Abgabe der Probenflüssigkeiten in eine parallele zweidimensionale Anordnung (z.B. eine Nanoliterplate oder ein Elektrophoresegel) überführt werden. Dabei wird der Reaktor nach dem Befüllen einer Kammer mit einem Probentropfen zur nächsten Kammer weitergeschoben. Der Austritt eines Tropfens kann durch die Brechung eines Lichtstrahls an dem Tropfen in der Trägerflüssigkeit (z.B. durch ein Fotometermodul des IPHT e.V. Jena) detektiert werden.

- Mehrlagenchiptechnik zur Aufnahme der Temperaturchips durch einen Verbindungschip und zur thermischen Isolation der Zonen.
- Verwendung von Chipmaterialien mit besonders hohen bzw. besonders niedrigen Wärmeleitfähigkeiten und Wärmeübergangskoeffizienten, um einerseits innerhalb der Temperaturzonen maximale Temperaturhomogenität und andererseits zwischen den Zonen maximale Temperaturgradienten zu erhalten.
- Verwendung von nur einer Kühlung an nur einem Chip um eine Integration der Temperaturregelung in allen drei Zonen zu gewährleisten. (Externe Kühlung ist zum Betrieb einer Temperaturregelung am Ort und über die Heizleistung unverzichtbar.)
- Die Rückführung der Reaktionslösung von Temperaturzone C nach A über Chip B in einem Rückführkanal mit stark vermindertem Querschnitt, um die Verweilzeiten der Lösung in Temperaturzone B zu minimieren.
- Durch Verwendung eines transparenten Verbindungschips zum Verschließen der Kanalstrukturen wird eine on line Prozeßkontrolle auf optischem Wege möglich.
- Die gleichzeitige Verwendung des μ -TZFR als Seriell - in - Parallel - Konverter (SPK) bestehend aus einem kontinuierlichen Trägerflüssigkeitsstrom in den die Proben injiziert werden, einer xy - Verschiebeeinheit und einer optischen Detektionseinheit zur Detektion der Probentropfen in der Trägerflüssigkeit beim Austritt aus dem μ -TZFR.

4. Nachteile bisheriger Lösungen:

Bei der von D. Larzul [1] vorgestellten Erfindung handelt es sich um eine Kapillare, die zu einer Spule aufgewickelt wurde. Der äußere Spulenkörper besteht aus sechs Segmenten, die die Temperaturzonen A, B und C und die drei dazugehörigen Übergangsstücke repräsentieren. Auf Grund der dreidimensionalen Anordnung ist dieses Verfahren nicht zur Miniaturisierung mittels der Chiptechnologie geeignet. Die Temperatureinstellung in der Probe ist ungenügend, da sich zwischen innerem und äußerem Spulenkörper, dort wo die Probenkapillare verlegt ist, ein Temperaturgradient aufbaut.

In [2] wird ein Flußthermocycler für die Polymerase Chain Reaction vorgestellt, bei dem ebenfalls eine Kapillare zum Einsatz kommt. Die Kapillare wird im Anwendungsbeispiel um drei Zylinder, die auf drei verschiedenen Temperaturen gehalten werden, gewickelt, so daß die Flüssigkeit, die in der Kapillare strömt auf die drei Temperaturen erwärmt wird. Aufgrund der dreidimensionalen Anordnung dieser Erfindung ist eine Miniaturisierung unter zur Hilfenahme der Chiptechnologie nicht möglich.

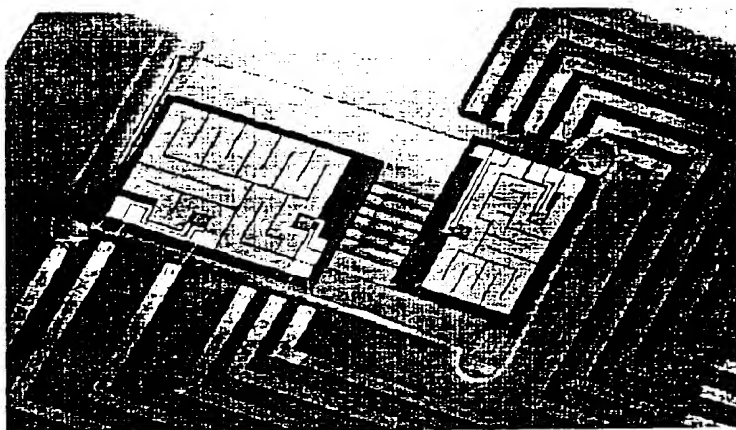
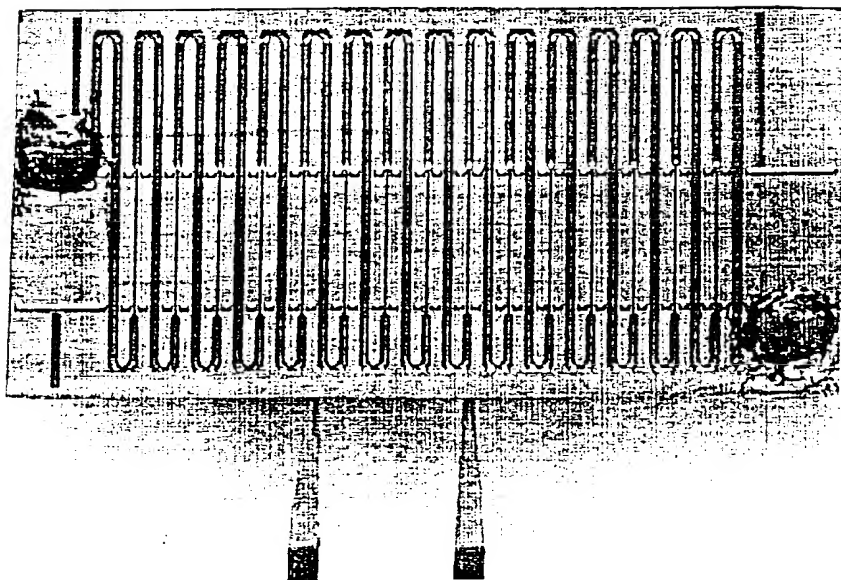
Durch die Kapillare wird kontinuierlich ein Öl gepumpt. An einem Einlaßventil werden die verschiedenen Proben hintereinander aufgegeben. Durch das Öl bleiben die Probentropfen voneinander getrennt. Jedoch enthält dieser Flußthermocycler keine Vorrichtung, um wie beim μ -TZFR den seriellen Probenfluß in eine parallele Anordnung zu überführen (SPK).

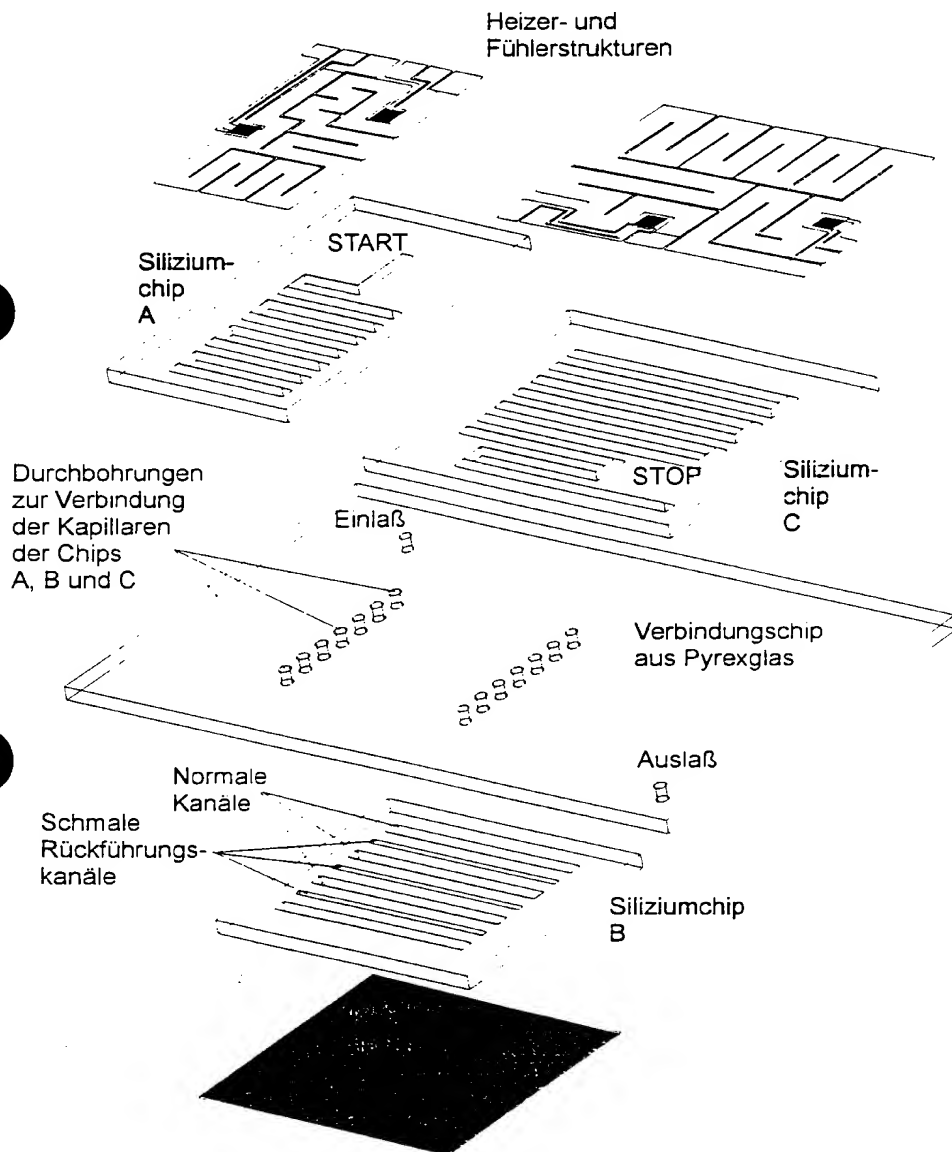
5. Verifizierung / Ausführungsbeispiel:

Als Beispiel wurde ein μ -TZFR in einem Silizium-Pyrexglas Verbund ausgeführt. Die drei Temperaturzonen wurden so ausgelegt, daß in A die Denaturierung doppelsträngiger DNS durchgeführt werden kann, daß in B die Anlagerung von Primern an einzelsträngiger DNS möglich wird (Annealing) und daß in C mittels TAQ-Polymerase die Primer-Extension ermöglicht wird. Die gemessenen Temperaturen betrugen: Zone A: 95°C; Zone B: 55°C; Zone C: 72°C. Durch Anschluß eines externen P-Reglers konnte die Temperatur in den Zonen auf 1°C konstant gehalten werden. Wenn der μ -TZFR bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 1 μ l/min betrieben wird so betragen die Verweilzeiten in den einzelnen Zonen: Zone A: 50 sec; Zone B: 50 sec; Zone C: 100 sec; Rückführungskanal: 1 sec. Die Trägerflüssigkeit durchläuft in dieser Konstruktion 4 mal jede Zone. Am Auslaß wurde mittels eines Photometermoduls die Segmentierung der Probenflüssigkeit zur Verwendung des μ TZFR als SPK überprüft (siehe Abbildung 4). Dazu wurde gefärbtes Wasser als Probe verwendet und Öl als Trägerflüssigkeit.

Die Siliziumchips und der Pyrexglaschip wurden mittels Mikrostrukturierung hergestellt. Die Chips wurden durch anodisches Bonden in der Reihenfolge wie, es in Abbildung 3 zu sehen ist, zusammengefügt.

8. Abbildungen

Abbildung 1. Foto des μ -TZFR Ausführung aAbbildung 2. Foto des μ -TZFR Ausführung b

Abbildung 3 Explosionszeichnung des μ -TZFR Ausführung a

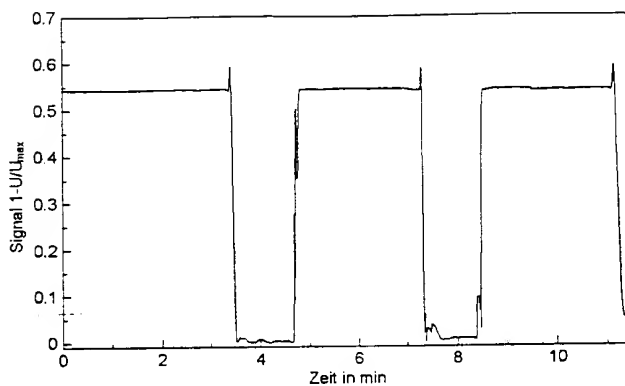
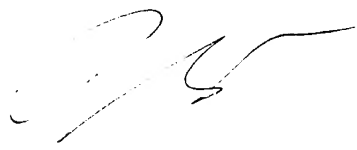


Abbildung 4. Photometermodul-Signal von Mineralöl als Trägerstrom mit gefärbtem Wasser als Probe am Auslaß des μ -TZFR Ausführung a.


Rolf-Gerd Pfeiffer
-Patentanwalt-

Ende der Übertragung